

褐飞虱乙酰胆碱酯酶基因全长 cDNA 的克隆及序列分析

杨之帆¹, 何光存^{2,*}

(1. 湖北大学生命科学学院, 武汉 430062; 2. 武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

摘要: 利用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)结合快速扩增 cDNA 末端(RACE)技术克隆了褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 乙酰胆碱酯酶基因 cDNA。该 cDNA 全长 2 467 bp, 包含一个 1 938 bp 的开放阅读框(GenBank 登录号 AJ852420); 在推导出的 646 个氨基酸残基的前体蛋白中, N 端的前 30 个氨基酸残基为信号肽, 随后的 616 个氨基酸残基是成熟的乙酰胆碱酯酶序列, 其预测的分子量为 69 418 D。在一级结构中, 形成催化活性中心的 3 个氨基酸残基(Ser242, Glu371 和 His485), 以及在亚基内形成二硫键的 6 个半胱氨酸完全保守; 位于催化功能域的 14 个芳香族氨基酸中有 10 个完全保守。该酶的氨基酸序列与黑尾叶蝉的同源性最高, 达 83%。对来自 23 种昆虫(包括褐飞虱)的 30 个乙酰胆碱酯酶的聚类分析显示, 褐飞虱的乙酰胆碱酯酶与其中 6 个 II 型乙酰胆碱酯酶(AChE2)同属一个支系; 此外, 只存在于昆虫 AChE2 中的超变区及特异的氨基酸残基, 也存在于褐飞虱的乙酰胆碱酯酶中。以上结果表明, 所克隆的褐飞虱的乙酰胆碱酯酶基因是一个与黑腹果蝇的 *orthologous* 型基因同源的 AChE2 基因。

关键词: 褐飞虱; 乙酰胆碱酯酶; cDNA 克隆; 聚类分析

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2006)06-1034-08

Molecular cloning and characterization of an acetylcholinesterase cDNA in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae)

YANG Zhi-Fan¹, HE Guang-Cun^{2,*} (1. School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China; 2. College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: A full cDNA encoding an acetylcholinesterase (AChE, EC3.1.1.7) from the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) was cloned and characterized. The complete cDNA (2 467 bp) contains a 1 938 bp open reading frame encoding 646 amino acid residues (GenBank accession no. AJ852420). The complete amino acid sequence of AChE deduced from the cDNA consists of 30 residues for the putative signal peptide and 616 residues for the mature protein with a predicted molecular weight of 69 418 D. The three residues (Ser242, Glu371 and His485) that putatively form the catalytic triad and six Cys that form intra-subunit disulfide bonds are completely conserved, and 10 out of the 14 aromatic residues lining the active site gorge of the AChE are also conserved. The deduced amino acid sequence is most similar to AChE of *Nephotettix cincticeps* with 83% amino acid identity. Phylogenetic analysis based on 30 AChEs from 23 insect species showed that the deduced AChE formed a cluster with 6 AChE2s. Additionally, the hypervariable region and amino acids specific to insect AChE2 also exist in *N. lugens* AChE. The results indicate that the AChE gene cloned in this work belongs to insect AChE2 subgroup, which are homologous to *Drosophila* AChE2.

Key words: *Nilaparvata lugens*; acetylcholinesterase; cDNA cloning; phylogenetic tree

乙酰胆碱酯酶(AChE, EC 3.1.1.7)的作用是及时分解神经递质乙酰胆碱, 从而终止神经冲动在中

枢及周边神经系统中的继续传递, 抑制乙酰胆碱酯酶的活性将导致动物的麻痹甚至死亡(Taylor,

基金项目: 国家自然科学基金项目(30500328; 30570140)

作者简介: 杨之帆, 男, 1971 年生, 博士, 主要从事昆虫与植物互作机理、植物分子生物学研究, E-mail: sailyangzhf@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: gche@whu.edu.cn

收稿日期 Received: 2006-05-17; 接受日期 Accepted: 2006-07-30

1991)。此外,在动物体内除神经系统外的其他部位,也有乙酰胆碱酯酶的合成,这些酶分子可能不具有分解乙酰胆碱的功能,而是作为调控因子参与细胞的生长及黏附过程(Soreq and Seidman, 2001)。在昆虫体内,乙酰胆碱酯酶是世界上使用最广的氨基甲酸酯类和有机磷杀虫剂的靶标酶(Harel *et al.*, 2000)。自 1986 年克隆到黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的第 1 个乙酰胆碱酯酶基因以来,人们相继从昆虫中克隆到的各类乙酰胆碱酯酶基因已超过 20 种,并对其中与人类生产生活密切相关的昆虫(如冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、铜绿蝇 *Lucilia cuprina*、马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 及棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 等)的乙酰胆碱酯酶进行了深入研究,在很大程度上揭示了这些乙酰胆碱酯酶的分子结构及相应昆虫产生抗药性的机理(Li and Han, 2004)。褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 是最重要的水稻害虫之一(Watanabe and Kitagawa, 2000),而关于褐飞虱乙酰胆碱酯酶基因的克隆及序列分析迄今未见报道,因而严重阻碍了人们对褐飞虱产生抗药性机理的进一步认识。我们克隆了褐飞虱乙酰胆碱酯酶基因的完整 cDNA,对所推导的乙酰胆碱酯酶与其他昆虫的乙酰胆碱酯酶进行了氨基酸序列比较及进化关系分析,并确定了该基因的类型。

1 材料与方 法

1.1 试虫

褐飞虱种群饲养在感虫水稻品种台中 1 号(TN1)上,温度为(25±2)℃,相对湿度 80%,光周期 16L:8D。收集 4 龄若虫用于分离总 RNA。

1.2 乙酰胆碱酯酶基因 cDNA 核心片段的克隆

参照说明书用 TRIzol 试剂(Invitrogen, USA)提取总 RNA。以 1.0 μg 经 DNase I 处理过的 RNA 为模板,采用引物 oligo d(T)15 和逆转录酶 MMLV(GIBCO BRL)在 20 μL 反应体系中合成 cDNA 第 1 链。

按 Zhu 等(2000)方法合成简并引物并进行巢式 PCR 反应,扩增产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶上电泳分开。将预期的 DNA 片段回收后,克隆于 pGEM-T easy 载体(Promega, USA)上,使用 M13 和 M13(-)通用引物进行双向测序,所用测序仪为 ABI-377 全自动序列分析仪(PE Applied Biosystems, USA)。根据测序结果设计出基因特异性引物(GSP),其中反义引物 GSP1 序列为 5'-GTCCTTGAGCCAGCGGATAGCA

AGGG-3'; 有义引物 GSP2 序列为 5'-CATGAGCGGCACAGCTACACTGGACG-3'。

1.3 快速扩增 cDNA 末端(5'和 3'RACE)

所用试剂盒为 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒(BD Bioscience Clontech Company, USA)。5' RACE-Ready cDNA 合成的反应体系为 10 μL,含有 1 μL 的 5'-CDS, 1 μL 的 BD SMART II A oligo, 1 μL 总 RNA(1 μg/μL), 2 μL 去离子水, 2 μL 的 5× 缓冲液, 1 μL 的 20 mmol/L 二硫苏糖醇, 1 μL 的 10 mmol/L dNTP 混合物和 1 μL BD PowerScript 反转录酶。3' RACE-Ready cDNA 合成的反应体系亦为 10 μL,含有 1 μL 的 3'-CDS 引物 A, 1 μL 总 RNA(1 μg/μL), 3 μL 的去离子水, 2 μL 的 5× 缓冲液, 1 μL 的 20 mmol/L 二硫苏糖醇, 1 μL 的 10 mmol/L dNTP 混合物和 1 μL BD PowerScript 反转录酶。将两组反应体系在 42℃ 保温 1.5 h 以完成 cDNA 第 1 链的合成。分别用 Tricine-EDTA 缓冲液稀释 10 倍备用。

扩增 5' cDNA 末端的反应体系为 50 μL,其中含有 34.5 μL ddH₂O, 5 μL 的 10× BD Advantage 2 PCR 缓冲液, 1 μL 的 10 mmol/L dNTP 混合物, 1 μL 的 50× BD Advantage 2 Polymerase Mix, 2.5 μL 的 5' RACE-Ready cDNA, 5 μL 的 10× UPM, 1 μL 的 10 μmol/L GSP1。扩增 3' cDNA 末端的反应体系为 50 μL,含有 34.5 μL ddH₂O, 5 μL 的 10× BD Advantage 2 PCR 缓冲液, 1 μL 的 10 mmol/L dNTP 混合物, 1 μL 的 50× BD Advantage 2 Polymerase Mix, 2.5 μL 的 3' RACE-Ready cDNA, 5 μL 的 10× UPM, 1 μL 的 10 μmol/L GSP2。使用 Touchdown 的程序进行 PCR 反应:首先在 94℃ 保温 30 s, 72℃ 3 min, 进行 5 轮循环;接着 94℃ 30 s, 70℃ 30 s, 72℃ 3 min, 进行 5 轮循环;随后 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 3 min, 进行 28 轮循环;最后于 72℃ 保温 7 min 以确保所有的 DNA 链合成完毕。以上 PCR 反应均在 PE-9700 PCR 仪(Perkin Elmer, USA)上进行。扩增产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶上电泳分开。

1.4 乙酰胆碱酯酶基因 cDNA 的测序及序列分析

将较亮的 DNA 带回收、克隆后测序。对来源于 5'和 3'RACE 的 cDNA 片段分别测 4 个以上的单克隆,以消除 PCR 反应过程中可能出现的碱基错配。

分别使用 DNAtools 6 和 ClustalX v1.8(Thompson *et al.*, 1997)软件进行核苷酸序列的翻译和氨基酸序列的比对分析。使用 Compute pI/Mw 在线工具(http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html)进行蛋白质分子量的预测。使用 SignalP 3.0 Server 在线工具

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 预测蛋白质前体的信号肽。使用 ClustalX v1.8 软件中的 N-J 选项(自举检验次数 = 1 000)进行分子系统树的构建(Page, 1996)。此外使用 NetNglyc 程序对蛋白质序列中可能存在的 N 糖基化位点进行预测(Nielsen *et al.*, 1997)。

2 结果与分析

2.1 褐飞虱乙酰胆碱酯酶基因 cDNA 的克隆及序

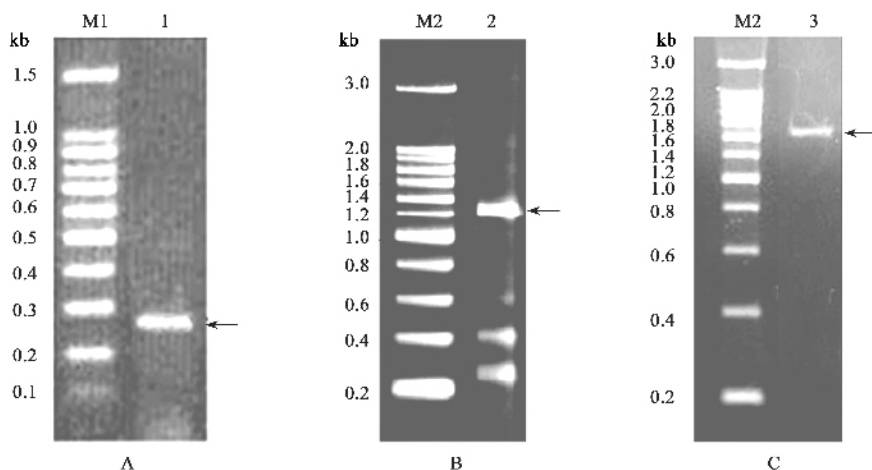


图 1 RT-PCR 第 2 轮扩增的结果(A)、5'RACE 结果(B)和 3'RACE 结果(C)

Fig. 1 Agarose gel (1.0%) showing the products of the nested RT-PCR (A), 5'RACE (B) and 3'RACE (C). Arrows indicate the interested DNA bands. M1: DNA ladder 100 bp; M2: DNA ladder 200 bp; 1: RT-PCR products; 2: 5'RACE products; 3: 3'RACE products.

对测序所得的 5'和 3' cDNA 末端的核苷酸序列进行拼接,得到褐飞虱乙酰胆碱酯酶基因的全长 cDNA,其长度为 2 467 bp。在该 cDNA 序列的 5'端存在 403 bp 的非翻译区(UTR),中间为 1 938 bp 的开放阅读框(ORF) 3'端非翻译区(UTR)长度为 123 bp(其中包括 29 bp 的 poly(A)尾巴)。在 poly(A)尾巴的上游 14 bp 处有一个典型的加尾信号序列(AATAAA)(图 2)。该序列在 GenBank 中的登录号为 AJ852420。

2.2 褐飞虱乙酰胆碱酯酶氨基酸序列分析

由全长 cDNA 预测的褐飞虱乙酰胆碱酯酶的前体酶原含有 646 氨基酸残基,其中位于 N 端的信号肽长度为 30 个氨基酸残基,随后是 616 个氨基酸残基的成熟多肽,即乙酰胆碱酯酶(图 2)。该酶的分子量(M_w)和等电点(pI)分别为 69 418.57 D 和 5.21,与来自黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps* 的 AChE(M_w/pI: 73 764.15/5.30; GenBank 登录号: AF145235-1)和

列分析

使用简并 RT-PCR 技术扩增出褐飞虱乙酰胆碱酯酶基因 cDNA 的核心片段(图 1:A),与 Zhu 等(2000)报道相符。测序表明该片段长 278 bp,经 BLAST 查询,证实此片段为乙酰胆碱酯酶基因 cDNA 的部分同源分子。根据此片段设计基因特异引物 GSP1 和 GSP2,用 RACE 技术扩增到乙酰胆碱酯酶基因的 5'和 3' cDNA 末端(图 1:B,C),将琼脂糖凝胶上的 DNA 带回收并克隆测序。

棉蚜 *Aphis gossypii* 的 AChE2(M_w/pI: 70 541.51/4.98; GenBank 登录号: AF502081-1)非常相近。根据预测,在成熟多肽的内部存在 4 个潜在的 N 糖基化位点(von Heijne, 1987),它们分别是位于第 113~115 位的 Asn-Leu-Ser,第 407~409 位的 Asn-Met-Thr,第 498~500 位的 Asn-Met-Ser 和第 605~607 位的 Asn-Met-Thr(图 2)。

将褐飞虱的乙酰胆碱酯酶与其他昆虫的 29 种乙酰胆碱酯酶(登录号见图 3 说明)的氨基酸序列进行同源性比较。结果表明,褐飞虱与黑尾叶蝉的同源性最高,达 83%;其次与马铃薯甲虫 *L. decemlineata* 和意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 的同源性同为 69%;与禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* 的 AChE1、桃蚜 *Myzus persicae* 的 AChE2、麦长管蚜 *Sitobion avenae* 的 AChE1、棉蚜的 AChE1 和麦二叉蚜 *Schizaphis graminum* 的乙酰胆碱酯酶同源性最低,均只有 33%;而与其余 21 种昆虫乙酰胆碱酯酶氨基

```

ACA GAC CCA TCA AAA CAG TGA AAC CGT ACG CCT AOC TAG CCG ACA GTT TTC ATT TTA TTC 61
TTG GCG GGA AAC AAG CGA AAT CAC CTT GAA AAT CTT CCA CCA GTT GGT GAA ATG GTG TTT
121
TTC CGT CCG CAA CAG ATG COT TAC CAA GTT GTT GCG TCG CCG GGT CCG CGT TCG AGT CCG
181
GCT TAG GCA CCG GCA TCC TCG CTT ATT ACA CCC AAC TGA CAG TTA CAA CAT CTG TGA TAA
241
AAT CTA GTG TGA TTC TAA TCG GCG ACA GAT TCG TGT TGA CTT CGA TAG CAT TGA GGA AGC
301
TCC CAT AAC CTG ACG TTT CGT CTC CCC CAC CAC AAC ATA CGA AGG TTG TAT CTA
361
GAC AGT GTT GAT GBA CTG AAA ATC CCA ATC TGC TGC AAT GAC TCG ACA AAA ATG GAC
M T S K M D 6
ACG AAA CAG GCG AGC ACA GAG CCA TGG AAG ACA GCC GTC CTG GGA GCC ATG TTC ACC ATG
481
T K Q A S T E P W K T A V L G A M F T M
248
ATG GTT COT AGT GGC AAA ATC GAA GGC CCG AGC TTC TCT CAG GAA CCG CAG CAG GAG GAA
568
M V L S G K I E G R S F S Q E R Q H E E
46
ATG AAG GAA TCC TGG TGT CAC ATG CAT CAC AGC GAT CCT CTA ATC GTC GAG ACT CAT AGC
601
M K E S S G H M H H S D P L I V E T H S
66
GGT CAC GTG AGA GGA ATC TCG AAG ACC CTC CTC GGA CCG GAG GTC CAC GTG TTT ACC GGG
861
G H V R G I S K T V L G R E V H C V F T G
86
ATT CCG TTT GCG AAA COT CCG ATC GGT CCG TTG CGA TTC COT AAA CCG GTT CCG GTC GAC
721
I P F A K P P I G P L R F R K P V P V D
106
CCG TGG CAC GGC GTT CTT GAT GCG ACC GCG CTT CCC AAC AGC TGC TAC CAG GAA CCG TAC
781
P W H G V L D A T A L P N S C Y Q E R Y
128
GAG TAT TTG CCG GGC TTC GAG GGA GAA GAA ATG TGG AAT CCG AAT ACG AAT TTG TCC GAA
841
E Y F P G F E G E E M W N P N T N L S E
146
GAT TGT CTG TAT TTG AAC ATA TGG GTG CCG CAC CCG TTG AGG ATC CGA CAC AGA GCC AAC
901
D C L Y L N I W V P H R L R I R H R A N
166
AGC GAG GAG AAT AAG CCA AGA GCG AAG GTG CCG GTG CTG ATC TGG ATC TAC GCG GCG GGT
961
S E E N K P R A K V P V L I W I Y G G G
186
TAC ATG AGC GGC ACA GCT ACA CTG GAC GTG TAC GAT GCT GAC ATG GTG GCG GCC ACG AGT
102
Y M S G T A T L D V Y D A D M V A A T S
206
GAC GTC ATC GTC GCC TCC ATC CAG TAC CGA GTG GGT GCG TTC GGC TTC CTC TAC CTC GCA
108
D V I V A S M Q Y R V G A F G F L Y L A
226
CAG GAC TTG CCT CGA GGC AGC GAG GAG GCG CCG GGC AAC ATG GGG CTC TGG CAG CAG GCG
114
Q D L P R G S E E A P G N M G L W D Q A
246
CTT GCT ATC CCG TCG CTC AAG GAC AAC ATT GCC GCC TTT GGA GGC GAT CCC GAA CTC ATG
120
L A I R W L K D N I A A F G G D P E L M
286
ACG CTG TTT GGC GAG TCG GCG GCG GGT GGA TCT GTG AGC ATC CAG TTG GTA TCA CCG ATA
126
T L F G E S A G G G S V S I H L V S P I
286
ACT CCG GGC CTA GCG CGT CGT GGC ATC ATG CAG TCA GGA ACG ATG AAC GCA CCG TGG AGC
132
T R G A L A R R G I M Q S G T M N A P W S
308
TTC ATG GCG GCG GAA CCG GCG ACC GAA ATC GCC AAG ACG CTC ATT GAC GAC TGC GGC TGC
1381
F M T A E R A T E I A K T L I D D C G C 328

```

图 2 褐飞虱乙酰胆碱酯酶基因 cDNA 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of AChE cDNA from *Nilaparvata lugens*

信号肽切割位点用箭头标识；四个 N 糖基化位点的氨基酸残基用方框标识；终止密码用星号标识；加尾信号序列(AATAAA)以下划虚线标识；GSP 引物序列以下划线标识。The signal peptide cleavage site is marked by a vertical arrow. Four potential N-linked glycosylation sites are boxed. The stop codon at the end of the coding region is marked with an asterisk. A putative polyadenylation signal (AATAAA) in the 3'-untranslated sequence is underlined with dots. The sequences of GSPs for 5' and 3' RACE are underlined.

酸序列的同源性介于 34% ~ 64% 之间。

目前在 GenBank 中收录的昆虫乙酰胆碱酯酶基因分为两大类,分别是果蝇 AChE 的 *paralogous* 基因(即 I 型基因 AChE1)和 *orthologous* 基因(即 II 型基因 AChE2)(Chen *et al.*, 2006)。作者构建系统树时所引用的 29 种昆虫乙酰胆碱酯酶基因中,21 种是 AChE2 基因,8 种是 AChE1 基因。系统树(图 3)显示了 30 种乙酰胆碱酯酶的进化关系。它们分属于 3 个支系,褐飞虱的乙酰胆碱酯酶与其中 6 个 AChE2 组成一个支系。在此支系中,褐飞虱与黑尾叶蝉的关系最近,组成一个独立的簇,两者之间的自举检验置信度为 981,暗示了它们可能由一个共同的祖先进化而来。在系统树中,德国小蠊自成一个支系;

而其余 22 个乙酰胆碱酯酶组成另一个大的支系,这其中包括了 14 个 AChE2 和 8 个 AChE1(图 3)。这一结果也表明,在长期的进化过程中昆虫的乙酰胆碱酯酶发生了重大分化。

通过深入研究,人们揭示了太平洋电鳐乙酰胆碱酯酶(Torpediniformes: Torpedinidae; Ac: P04058)一级结构中所有的保守序列和位点(Schumacher *et al.*, 1986; Sussman *et al.*, 1991),而这些保守的序列和位点绝大多数在褐飞虱的乙酰胆碱酯酶中存在(图 4)。这些结构特点总结如下[按惯例,括号中的数字为太平洋电鳐乙酰胆碱酯酶的相应氨基酸残基的位置(Massoulié *et al.*, 1992)](1)组成活性位点的保守的氨基酸残基,即 S242(200),E371(327)和

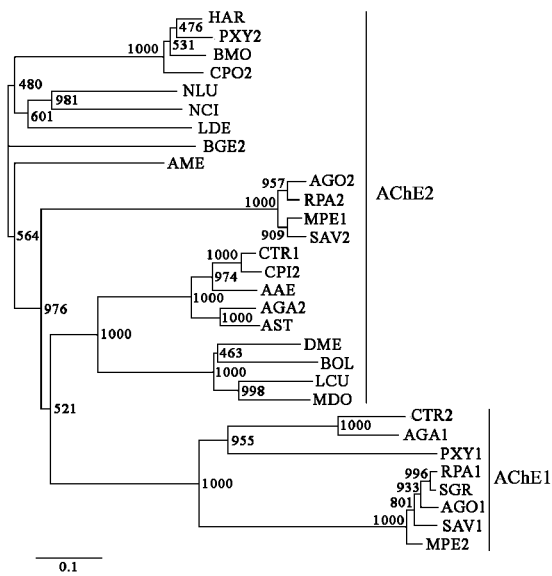


图3 使用邻接法构建的包含褐飞虱及其他29种昆虫乙酰胆碱酯酶的系统树

Fig. 3 Phylogenetic trees of the deduced AChE amino acid sequences constructed with the neighbor-joining method 1 000 次的自举检验置信度值标于分枝线上。比例尺代表每点 0.1 个核苷酸的替换。乙酰胆碱酯酶名称用相应昆虫属名的第一个字母加上种名的前两个字母表示。The bootstrap values with 1000 trials are indicated on branches. The scale bar represents 0.1 nucleotide substitutions per site. The AChE name is made up of an abbreviation of species name (the first letter of genus name followed by the first two letters of the specific name). 所引用的乙酰胆碱酯酶的来源及 GenBank 登录号如下 Sequences used and their GenBank accession numbers: HAR: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, AY142325; PXY1: 小菜蛾 *Plutella xylostella* AChE1, AY970293; PXY2: 小菜蛾 *P. xylostella* AChE2, AY061975-1; BMO: 家蚕 *Bombyx mori*, DQ115792; CPO2: 苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* AChE2, DQ267976; NLU: 褐飞虱 *Nilaparvata lugens*, AJ852420; NCI: 黑尾叶蝉 *N. cincticeps*, AF145235-1; LDE: 马铃薯甲虫 *L. decemlineata*, Q27677; BGE2: 德国小蠊 *Blattella germanica* AChE2, DQ288847; AME: 意大利蜜蜂 *Apis mellifera*, AF213012; AGO1: 棉蚜 *A. gossypii* AChE1, AF502082; AGO2: 棉蚜 *A. gossypii* AChE2, AF502081-1; RPA1: 禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* AChE1, AY667435; RPA2: 禾谷缢管蚜 *R. padi* AChE2, AY707318; MPE1: 桃蚜 *Myzus persicae* AChE1, AF287291-1; MPE2: 桃蚜 *M. persicae* AChE2, AY147797; SAV1: 麦长管蚜 *Sitobion avenae* AChE1, AY819704; SAV2: 麦长管蚜 *S. avenae* AChE2, AY707319-1; CTR1: 三带喙库蚊 *Culex tritaeniorhynchus* AChE1, AB122151-1; CTR2: 三带喙库蚊 *C. tritaeniorhynchus* AChE2, AB122152; CPI2: 尖音库蚊 *Culex pipiens* AChE2, AM159193; AAE: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*, S66236; AGA1: 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* AChE1, AJ512511; AGA2: 冈比亚按蚊 *A. gambiae* AChE2, BN000067-1; AST: 斯氏按蚊 *Anopheles stephensi*, P56161; DME: 黑腹果蝇 *D. melanogaster*, NM057605; BOL: 橄榄果实蝇 *Bactrocera oleae*, AF452052-1; LCU: 铜绿蝇 *L. cuprina*, J88631-1; MDO: 家蝇 *Musca domestica*, AF281161-1; SGR: 麦二叉蚜 *Schizaphis graminum*, AF321574。系统树用昆虫乙酰胆碱酯酶全长序列构建。The tree was constructed with the full sequences of the insect AChEs.

(94), C296 (254)-C311 (265) 和 C447 (402)-C563 (521); (4) 涵盖 S242 (200) 位点的序列 FGESAG, 这在所有的乙酰胆碱酯酶中均保守; (5) F334 (290), 这个保守的芳香族氨基酸残基存在于所有无脊椎动物乙酰胆碱酯酶分子的酰基口袋处 (Sutherland *et al.*, 1997); (6) 在太平洋电鳐乙酰胆碱酯酶分子的催化功能域中存在 14 个保守的芳香族氨基酸残基, 其中 10 个在褐飞虱乙酰胆碱酯酶中完全保守, 它们是 W108、W151、Y167、W275、W326、F334、Y374、F375、Y378 和 W477, 而其他 4 个被不保守的氨基酸残基所取代, 它们是 Z94 (Y70)、M158 (Y121)、S336 (F292) 以及 D489 (Y442)。图 4 的氨基酸序列比对结果表明, 褐飞虱乙酰胆碱酯酶序列中含有只在昆虫 AChE2 中出现的特异氨基酸残基, 这些保守的氨基酸残基在昆虫 AChE1 中不保守; 此外, 只存在于 AChE2 中而 AChE1 中没有的超变区同样出现在褐飞虱的乙酰胆碱酯酶序列中。

3 讨论

本实验采用 RT-PCR 结合 RACE 技术克隆了褐飞虱乙酰胆碱酯酶的全长 cDNA, 并对其核苷酸序列及推导的氨基酸序列进行了分析。该酶与黑尾叶蝉的乙酰胆碱酯酶在氨基酸序列上存在 83% 的同源性。太平洋电鳐乙酰胆碱酯酶一级结构中的绝大多数保守的氨基酸残基 (Schumacher *et al.*, 1986) 在褐飞虱的乙酰胆碱酯酶中可以找到。Sussman 等 (1991) 研究发现, 太平洋电鳐乙酰胆碱酯酶分子中的 14 个芳香族氨基酸残基形成一个底物通道, 乙酰胆碱通过此通道到达并接近催化活性位点的丝氨酸, 从而完成生化反应。在褐飞虱的乙酰胆碱酯酶中, 形成底物通道的 14 个芳香族氨基酸有 10 个是保守的, 4 个被非芳香族氨基酸残基取代 (图 4), 在其他 29 种昆虫的乙酰胆碱酯酶中, 也出现了相应位置的 4 个芳香族氨基酸被非芳香族氨基酸取代的现象。这一结果表明 4 个芳香族氨基酸被取代并不影响昆虫乙酰胆碱酯酶的功能, 另一方面也反映了在动物的进化过程中, 该酶的分子结构在脊椎动物和昆虫中的分化差异。在褐飞虱乙酰胆碱酯酶中还存在 4 个 N 糖基化位点, 它们可能对于该酶的定位是必须的, 这是因为在无脊椎动物中, 乙酰胆碱酯酶分子需要通过磷酸酰糖苷键锚定在细胞膜上才能发挥正常的生理功能 (Gagny *et al.*, 1987)。

通过对褐飞虱的乙酰胆碱酯酶与 29 种昆虫的

H485 (440); (2) 胆碱结合位点 W108 (84); (3) 形成二硫键的 3 对半胱氨酸残基, 即 C91 (67)-C118

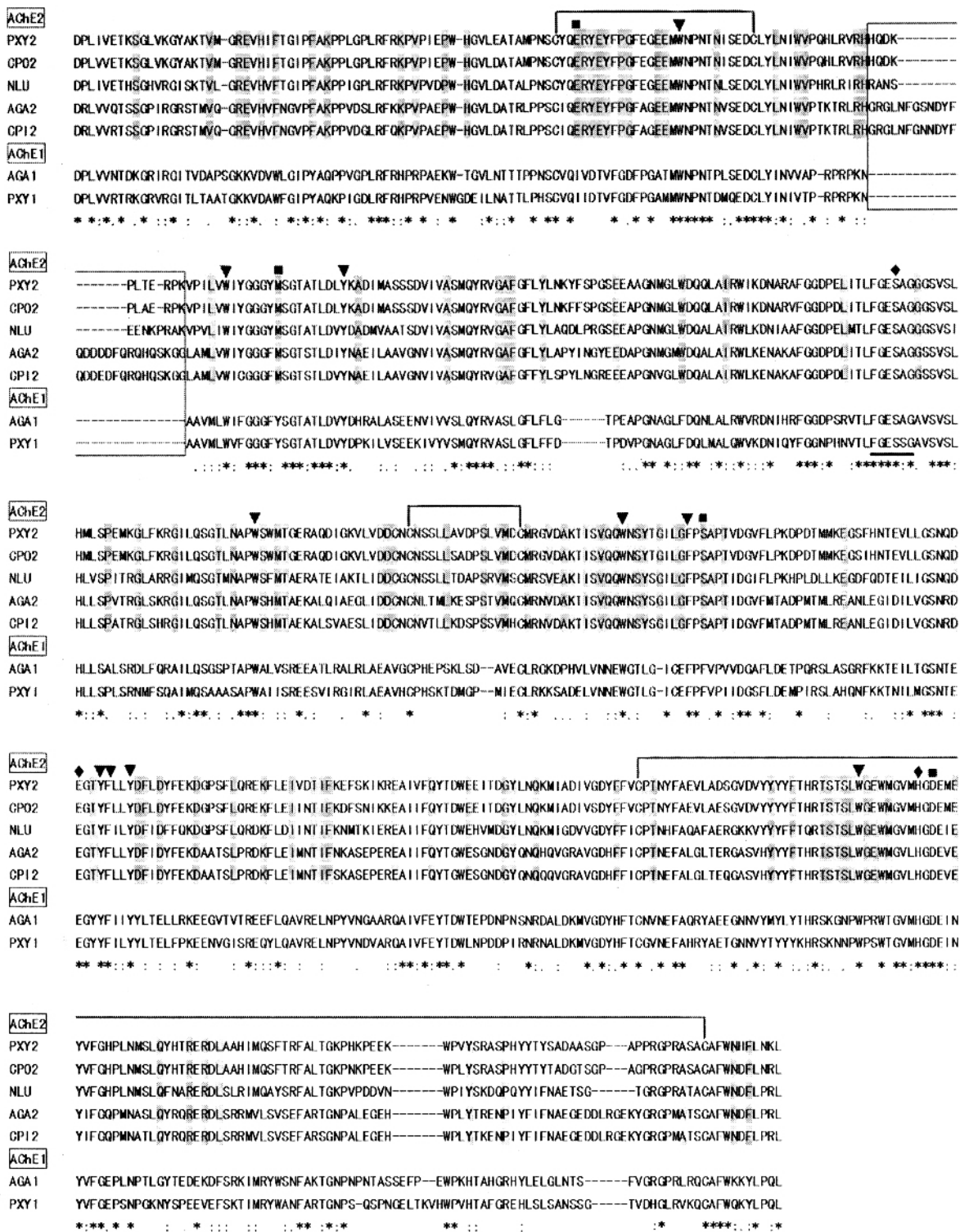


图 4 褐飞虱乙酰胆碱酯酶与其他 4 种昆虫的乙酰胆碱酯酶的氨基酸序列比较

Fig. 4 Alignment of 7 AChEs from *Nilaparvata lugens* (N.l.) and other four insects

6 种昆虫的乙酰胆碱酯酶是: PXY1 小菜蛾 *P. xylostella* AChE1, AY970293; PXY2 小菜蛾 *P. xylostella* AChE2, AY061975-1; AGA1 冈比亚按蚊 *A. gambiae* AChE1, AJ512511; AGA2 冈比亚按蚊 *A. gambiae* AChE2, BN00067-1; CPl2 瘿蚊 *C. pipiens* AChE2, AM159193; CPO2 苹果蠹蛾 *C. pomonella* AChE2, DQ267976。所有序列均去除了 N 端和 C 端的非保守序列; 相同的氨基酸以星号标识; 保守的氨基酸以点号标识; 参与形成催化活性位点的氨基酸用菱形标识; 位于催化活性位点的保守的芳香族氨基酸残基以三角标识; 可能被取代的芳香族氨基酸残基以实心小方块标识; 胆碱酯酶识别序列以粗下划线标识; 参与形成二硫键的半胱氨酸残基以线条相连; 有灰色阴影的氨基酸残基为昆虫 AChE2 所特有; 只存在于 AChE2 中而 AChE1 中缺乏的超变区位于方框中。The N- and C- terminal sequences are not represented because of their variability. Identical amino acids are indicated by asterisks and conservative substitutions by dots. The residues forming catalytic triads are depicted with diamonds. The positions of conserved aromatic residues lining the active site gorge are marked with triangles. The positions of non-aromatic residues that possibly substitute the aromatic residues lining the active site gorge are marked with little solid squares. The cholinesterase signature sequence is marked with a bold underline. Cysteine residues involved in intrachain disulfide bonds are connected by lines. Amino acids in grey are specific to AChE2. The hypervariable region of AChE2, absent in AChE1, is boxed.

乙酰胆碱酯酶的氨基酸序列比较,我们发现,褐飞虱与其中 21 种昆虫的 AChE2 的同源性达 54% ~ 83%,而与 8 种昆虫的 AChE1 的同源性只有 33% ~ 40%。从图 3 系统树显示的结果可以看出,褐飞虱的乙酰胆碱酯酶与其中 6 种昆虫的 AChE2 组成一个支系,表明它们亲缘关系较近。此外,褐飞虱乙酰胆碱酯酶序列中含有只在昆虫 AChE2 中存在的超变区及特异氨基酸残基,而该超变区及特异氨基酸残基在昆虫 AChE1 中不存在或不保守(图 4)。以上结果表明,所克隆的褐飞虱乙酰胆碱酯酶基因是一个与黑腹果蝇的 *orthologous* 型基因同源的 AChE2 基因。

目前,由于杀虫剂的滥用,导致了許多农业害虫和人畜寄生虫出现了抗药性,表现为乙酰胆碱酯酶降低了对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的敏感性,而乙酰胆碱酯酶分子中特定氨基酸残基的替换是导致这种敏感性下降的重要原因之一(Li and Han, 2004; Nabeshima *et al.*, 2004; Russell *et al.*, 2004)。这反映了乙酰胆碱酯酶一级结构的变构在昆虫形成抗药性方面的重要性,使乙酰胆碱酯酶的毒理学研究更加具有意义。长期以来人们主要通过喷洒杀虫剂来防治褐飞虱,但持续使用杀虫剂带来的问题是褐飞虱天敌的减少、褐飞虱抗药性的增强、种群的再次暴发及环境的严重污染(Miyata and Saito, 1984; Sujatha and Regupathy, 2003)。要解决这些问题,必须充分了解褐飞虱的抗药性机理。本实验所克隆的褐飞虱乙酰胆碱酯酶基因 cDNA 在一定程度上揭示了该酶的分子生物学特性。由于有些昆虫的抗药性由 AChE1 变构引起,而在另一些昆虫中则由 AChE2 变构导致抗药性(Weill *et al.*, 2002),所以有必要进一步确定褐飞虱中是否存在另一个乙酰胆碱酯酶(AChE1)基因及其与抗药性的关系;目前相关的工作正在进行中。对抗、感两种褐飞虱来源的乙酰胆碱酯酶基因的对比研究,将从分子水平上揭示其抗药性本质,从而有助于我们最终实现褐飞虱的抗性监测和抗性治理的目的。

参 考 文 献 (References)

Chen MH, Han ZJ, 2006. Cloning and sequence analysis of 2 different acetylcholinesterase genes in *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion avenae*. *Genome*, 49: 239–243.

Gagny AL, Forte M, Rosenberry TL, 1987. Isolation and characterization of acetylcholinesterase from *Drosophila*. *J. Biol. Chem.*, 262: 13 290–13 298.

Harel M, Kryger G, Rosenberry TL, Mallender WD, Lewis T, Fletcher RJ,

2000. Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and its complexes with two potent inhibitors. *Protein Science*, 9: 1 063–1 072.

Li F, Han ZJ, 2004. Mutations in acetylcholinesterase associated with insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34: 397–405.

Massoulié J, Sussman JL, Doctor BP, Soreq H, Velan B, Cygler M, Rotundo R, Shafferman A, Silman I, Taylor P, 1992. Recommendations for nomenclature in cholinesterases. In: Shafferman A, Velan B eds. *Multidisciplinary Approaches to Cholinesterase Functions*. New York: Plenum. 285–288.

Miyata T, Saito T, 1984. Development of insecticide resistance and measures to overcome resistance in rice pests. *Prot. Ecol.*, 7: 183–199.

Nabeshima T, Mori A, Kozaki T, Iwata Y, 2004. An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313: 794–801.

Nielsen H, Engelbrecht Y, Brunak S, Heijne G, 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engin.*, 10: 1–6.

Page RMW, 1996. TREEVIEW: an application to display phylogenetic tree on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.*, 12: 357–358.

Russell RJ, Claudianos C, Campbell PM, Home I, Sutherland TD, Oakeshott JG, 2004. Two major classes of target site insensitivity mutations confer resistance to organophosphate and carbamate insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 79: 84–93.

Schumacher M, Camp S, Maulet Y, Newton M, MacPhee-Quigley K, Taylor SS, Friedmann T, Taylor P, 1986. Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature*, 319: 407–409.

Soreq H, Seidman S, 2001. Acetylcholinesterase: new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2: 294–302.

Sujatha D, Regupathy A, 2003. Development of resistance to carbofuran, phosphamidon and neem oil in rice BHP, *Nilaparvata lugens* populations in Tamil Nadu, India. *Pestic. Res. J.*, 15: 194–197.

Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Tokar L, Silman I, 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253: 872–879.

Sutherland D, McClellan JS, Milner D, Soong W, Axon N, Sanders M, Hester A, Kao YH, Poczatek T, Routt S, Pezzementi L, 1997. Two cholinesterase activities and genes are present in amphioxus. *J. Exp. Zool.*, 277: 213–229.

Taylor P, 1991. The cholinesterases. *J. Biol. Chem.*, 266: 4 025–4 028.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Res.*, 24: 4 876–4 882.

von Heijne G, 1987. *Sequence Analysis in Molecular Biology*. San Diego: Academic Press.

Watanabe T, Kitagawa H, 2000. Photosynthesis and translocation of

- assimilates in rice plants following phloem feeding by the planthopper *Nilaparvata lugens* Stål. (Homoptera : Delphacidae). *J. Econ. Entomol.* , 93 : 1 192 - 1 198.
- Weill M , Fort P , Berthomieu A , 2002. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the *ace* gene in *Drosophila*. *Proc. R. Soc. Lond. B* , 69 : 2 007 - 2 016.
- Zhu KY , Gao JR , Starkey SR , 2000. Organophosphate resistance mediated by alterations of acetylcholinesterase in a resistant clone of the greenbug , *Schizaphis graminum* (Homoptera : Aphididae). *Pestic. Biochem. Physiol.* , 68 : 138 - 147.

(责任编辑 : 黄玲巧)